

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年3月27日 (27.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/025190 A1

- (51) 国際特許分類7: C12N 15/861, 7/01, A61K 48/00
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/00724
(22) 国際出願日: 2002年1月30日 (30.01.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2001-279088 2001年9月14日 (14.09.2001) JP
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 プライミューン (PRIMMUNE K.K.) [JP/JP]; 〒
540-0026 大阪府 大阪市 中央区内本町1-2-5 YSKビル
6階 Osaka (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 濱田 雄行
(HAMADA,Katsuyuki) [JP/JP]; 〒790-0931 愛媛県 松
山市 西石井町78-1 Ehime (JP).
(74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA,Kiyoshi et al.); 〒
100-0004 東京都 千代田区 大手町2丁目2番1号 新
大手町ビル331 Tokyo (JP).
(81) 指定国(国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.
(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[続葉有]

(54) Title: TUMOR-SPECIFIC PROMOTER AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 腫瘍特異的プロモーターおよびその用途

オンコリイテックアデノウイルス
Ad-IAI.3B-1816のin vivo抗腫瘍活性



a... IN VIVO ANTITUMOR ACTIVITY OF ONCOLYTIC ADENOVIRUS
Ad-IAI.3B-1816
b... GROUP WITH Ad-IAI.3B-1816 ADMINISTRATION
c... CONTROL GROUP

(57) Abstract: A promoter domain of 1816 bp or 441 bp in the upstream side of exon 1B of IAI.3B gene has a specifically high promoter activity in ovarian cancer cells. An adenovirus having this promoter domain inserted in the E1 domain thereof exhibits a specifically high cell proliferation inhibitory effect on ovarian cancer cells. Thus, it is efficacious in gene therapy for ovarian cancer.

(57) 要約:

WO 03/025190 A1

IAI.3B遺伝子のエクソン1Bの上流側の1816bpまたは441bpのプロモーター領域は、卵巣癌細胞において特異的に高いプロモーター活性を有し、このプロモーター領域をE1領域に挿入したアデノウイルスは、卵巣癌細胞に対して特異的に高い細胞増殖抑制効果を発揮し、卵巣癌の遺伝子治療に有効である。

WO 03/025190 A1



添付公開書類:

- 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

腫瘍特異的プロモーターおよびその用途

5 技術分野

本発明は、卵巣癌などの腫瘍細胞もしくは腫瘍組織において特異的な遺伝子の発現を可能にする腫瘍特異的プロモーターおよびその用途に関する。更に詳細には、本発明は、腫瘍細胞もしくは腫瘍組織、特に卵巣癌細胞もしくは卵巣癌組織において特異的に高いプロモーター活性を発揮し、腫瘍特異的な遺伝子発現による癌、特に卵巣癌の遺伝子治療を可能にする腫瘍特異的プロモーターおよび該腫瘍特異的プロモーターを用いてウイルスを腫瘍細胞あるいは腫瘍組織、特に卵巣癌細胞もしくは卵巣癌組織で特異的に増殖するようにウイルス遺伝子を改変した細胞障害性腫瘍特異的ウイルスに関する。更に本発明は、この細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを用いた腫瘍の治療方法に関する。

15

背景技術

卵巣癌は、欧米において五大癌の一つとされ、日本においては年間約4000人の人が卵巣癌によって死亡しており、40年間でその死亡数が約30倍に急速に増加し、肺癌、膵臓癌とともに最も増加している癌の一つである。卵巣癌は腹腔内に存在し、早期診断が困難であること、卵巣の被膜が容易に破綻し早期において腹腔内に転移しやすいことなどから、その60%の人が死に至るとされ、膵臓癌とともに最も予後不良な癌の一つである。手術方法の開発、シスプラチン、タキソールなどの抗癌剤の開発により治療成績の改善が認められるものの、それ以降の治療法の改善において有効なものがなく、新たな治療法の開発が望まれている。

最近、癌抑制遺伝子、サイトカイン遺伝子などを癌細胞に導入して癌を治療する遺伝子治療が各種の癌において試みられ、臨床的有効性が確認されるに至っている。卵巣癌においてもアデノウイルスベクターを用いた癌抑制遺伝子 p53による遺伝子治療が、シスプラチンおよびタキソールによる治療に反応しなかった再発性卵巣癌において20%以上の臨床的有効性（50%以上の腫瘍の縮小）を示すこと

が明らかになった (J. K. Wolf et al., Proceedings of American Society of Clinical Oncology, Vol. 19, May 2001, 382)。また、アデノウイルスの腫瘍細胞に対する細胞溶解 (cell lysis) の効果を期待したオンコリティック (oncolytic) アデノウイルスが開発され各種癌において有効性が確認されるに

5 至っている (Carla Heise et al., The Journal of Clinical Investigation, April 2000, Vol. 105, No. 7, 847-851; James R. Bischoff et al., Science, Vol. 274, 18 October 1996, 373-376; J. Nemunaitis et al., Journal of Clinical Oncology, Vol. 19, No. 2, 2001, 289-298)。また、ヘルペスウイルスを利用したオンコリティックヘルペスウイルスの細胞溶解効果も報告されてい
10 10 (Miyatake S. et al., Gene Ther. 1999, Vol. 6, 564-572)。しかしながら、このような遺伝子治療に用いられるウイルスベクターにおいては、従来よりCMV、RSV等のウイルスプロモーターが使用され、組織特異性がないため肝臓への毒性等により、投与量が制限されていたため効果の改善が期待できない面を有していた。

15 腸器特異的プロモーターを用いたベクターによる遺伝子治療の開発も行われている。即ち、例えばオステオカルシンプロモーターを用いたベクターによる前立腺癌の骨転移の遺伝子治療 (Shirakawa et al., Cancer Gene Therapy, 1998 Sep-Oct., 5(5), 274-280, 1998)、アルブミンプロモーターを用いたベクターによる血友病の遺伝子治療 (Alemany et al., J. Virol. Methods, 1997 Nov; 20 68(2): 147-159)、PSAプロモーターを用いたベクターによる前立腺癌の遺伝子治療 (Gotoh et al., J. Urol. 1998 Jul. 160(1): 220-229) による臨床試験が既に始まろうとしている。しかしながら、卵巣癌特異的遺伝子プロモーターを用いた遺伝子治療に関する報告はなされていない。

他方、転移性卵巣癌の胸水中の卵巣癌に特異的な蛋白分画を多く含む高分子量
25 領域の蛋白を抗原として、ウサギに免疫して作成した抗体を用いて、卵巣癌細胞株OVCA432のcDNAライブラリーのスクリーニングによりplaques精製されクローニングされた遺伝子としてIAI.3B遺伝子が報告されている (Cambell I.G., et al., Human Molecular Genetics, 1994, Vol. 3, No. 4, 589-594)。IAI.3B遺伝子のオープン・リーディング・フレームは2990bpでそれによってコードされる蛋

白のアミノ酸配列は966個よりなりその分子量108kdであり、また、IAI. 3B遺伝子によってコードされる蛋白はトランスフォーメーションポテンシャルを有するB-ボックス蛋白であり、そのゲノム遺伝子は、染色体17q21. 1に位置する卵巣癌および乳癌の癌抑制遺伝子であるBRCA1遺伝子の近傍のテロメアに位置することも
5 報告されている (Cambell I. G., et al., Human Molecular Genetics, 1994, Vol. 3, No. 4, 589–594)。また、IAI. 3B遺伝子とBRCA1遺伝子とは、プロモーターとエンハンサー領域とを共有していることも示唆され (Melissa A. Brown et al., Nature, Vol. 372, 22/29 December 1994, 733)、それぞれの遺伝子発現調節機構が卵巣癌の発癌および増殖に重要な役割を果たしている可能性も示唆さ
10 れている (Melissa A. Brown et al., Oncogene, 1996, 12, 2507–2513)。BRCA1遺伝子のプロモーター領域の活性については既に明らかにされているが (Smith et al., Genome Res., 1996 Nov. ; 6(11): 1029–1049)、IAI. 3B遺伝子のプロモーター活性に関する報告はなされていない。

15 発明の開示

卵巣癌細胞もしくは卵巣癌組織において特異的にそのプロモーター機能を発揮する腫瘍特異的プロモーターを用いて各種ウイルスベクターを構築し、このウイルスベクターによる遺伝子治療を行えば、特に卵巣癌においてのみ目的遺伝子を発現させることが可能となり、従来の遺伝子治療で課題とされていた副作用の軽
20 減および臨床効果の改善が達成できる。

従って、本発明の目的は、卵巣癌などの腫瘍細胞もしくは腫瘍組織、特に卵巣癌細胞もしくは卵巣癌組織において特異的に高いプロモーター活性を発揮し、腫瘍特異的な遺伝子発現による癌、特に卵巣癌の遺伝子治療を可能にする腫瘍特異的プロモーターを提供することにある。

25 更に本発明の他の目的は、該腫瘍特異的プロモーターを用いてウイルスを腫瘍細胞あるいは腫瘍組織、特に卵巣癌細胞もしくは卵巣癌組織で特異的に増殖するようウイルス遺伝子を改変した細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを提供することにある。

更に本発明の他の目的は、該細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを用いた腫瘍の治

療方法を提供することにある。

本発明者は、卵巣癌において遺伝子の活性が更新していることが期待される IAI. 3B遺伝子のプロモーター領域のクローニングを試み、IAI. 3B遺伝子のエクソン1Bの上流域特に1816bpまたは441bpからなる遺伝子であって配列表の配列番号1に示す1126～2941番目の塩基配列または2501～2941番目の塩基配列を有する遺伝子が特に卵巣癌において特異的に高いプロモーター活性を発揮し得ること、そして細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを構築するためのプロモーターとして有用であることを見出し、本発明を完成させた。

即ち、本発明は、配列表の配列番号1に示す1126～2941番目または2501～2941番目の塩基配列を有する腫瘍特異的プロモーターに関する。

更に本発明は、配列表の配列番号1に示す1126～2941番目または2501～2941番目の塩基配列とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、それらの塩基配列と同様のプロモーター機能を有する腫瘍特異的プロモーターに関する。このような腫瘍特異的プロモーターは、好ましくは配列表の配列番号1に示す2626～2941番目、2376～2941番目、1251～2941番目または1001～2941番目の塩基配列を有するものである。好ましくは、本発明の上記腫瘍特異的プロモーターは卵巣癌に特異的なプロモーターである。

更に本発明は、上記腫瘍特異的プロモーターを用いてウイルスを腫瘍細胞あるいは腫瘍組織で特異的に増殖するようにウイルス遺伝子を改変した細胞障害性腫瘍特異的ウイルスに関する。好ましくは、本発明の上記細胞障害性腫瘍特異的ウイルスは卵巣癌に特異的なものである。更に好ましくは、本発明の上記細胞障害性腫瘍特異的ウイルスはアデノウイルスである。

更に本発明は、上記細胞障害性腫瘍特異的ウイルスをヒトに投与することからなる腫瘍の治療方法に関する。好ましくは、上記細胞障害性腫瘍特異的ウイルスとともに抗癌化学療法剤を投与する治療方法である。

図面の簡単な説明

図1は、IAI. 3Bゲノム遺伝子とBRCA1ゲノム遺伝子との関係を示した図である。

図2は、IAI. 3B遺伝子のプロモーター領域の各欠失変異体と、それらを挿入し

たルシフェラーゼベクターとの関係を示した図である。

図3は、IAI. 3B遺伝子のプロモーター領域の各欠失変異体を挿入したルシフェラーゼベクターにおけるプロモーター活性を示したグラフである。

図4は、IAI. 3B遺伝子のプロモーター領域の1816bpおよび441bp欠失変異体を
5 挿入したルシフェラーゼベクターにおける各種細胞株でのプロモーター活性を示
したグラフである。

図5は、樹立化卵巣癌細胞株（OC）におけるプロモーターIAI. 3B-1816の転写
活性を子宮頸癌（CC）と正常ヒト卵巣細胞株（NOE）における転写活性と比較し
たグラフである。

10 図6は、樹立化卵巣癌細胞株（OC）におけるプロモーターIAI. 3B-1816の転写
活性を子宮頸癌（CC）と正常ヒト卵巣細胞株（NOE）における転写活性と比較し
たグラフである。

図7は、初代培養卵巣癌細胞株（pOC）におけるプロモーターIAI. 3B-1816の転
写活性を子宮頸癌（CC）と正常ヒト卵巣細胞株（NOE）における転写活性と比較
15 したものである。

図8は、IAI. 3B遺伝子のプロモーター領域の1816bp欠失変異体がE1A遺伝子の
プロモータ領域に挿入されたオンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816の
構築過程を示した図である。

図9は、オンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816の各種細胞株に対する
20 増殖抑制効果を示したグラフである。

図10は、オンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816のin vivo抗腫瘍
活性を示したグラフである。

図11は、ヌードマウスにおけるオンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-
1816のin vivo抗腫瘍活性を示した写真である。

25 図12は、オンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816とシスプラチン
(CDDP)との抗癌活性相乗効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の腫瘍特異的プロモーターは、IAI. 3B遺伝子におけるプロモーター領域

についての詳細な研究により初めて得られたものである。前記した通り、IAI. 3B遺伝子は、転移性卵巣癌の胸水中に存在する高分子量領域の蛋白に対して作成した抗体を用いた卵巣癌細胞株OVCA432のcDNAライブラリーのスクリーニングによりクローニングされた遺伝子である。図1に示すように、IAI. 3Bゲノム遺伝子は、
5 染色体17q21. 1に存在する卵巣癌および乳癌の癌抑制遺伝子であるBRCA1遺伝子の近傍のテロメアにアンチセンスに位置し、両者のゲノム遺伝子の間には、それぞれの遺伝子の偽遺伝子（pseudo gene）がアンチセンスに配列してプロモーターとして存在している。即ち、IAI. 3B遺伝子のプロモーターは、BCRA1遺伝子の偽遺伝子のエクソン2、エクソン1B、エクソン1Aがアンチセンスに配列したもので
10 ある。

本発明の腫瘍特異的プロモーターは、配列表の配列番号1に示す塩基配列において1126～2941番目または2501～2941番目の塩基配列からなるものである。配列番号1の2941番目の塩基は、IAI. 3B遺伝子のエクソン1Bの5'末端から1bp上流に位置する塩基に相当する。従って、配列番号1に示す塩基配列において1126～
15 2941番目または2501～2941番目の塩基配列からなる本発明の腫瘍特異的プロモーターは、IAI. 3B遺伝子のエクソン1Bの上流側に位置するそれぞれ1816bpまたは441bpの塩基配列に相当する。

本発明の腫瘍特異的プロモーターは、上記した配列表の配列番号1に示す1126～2941番目または2501～2941番目の塩基配列とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、それらの塩基配列と同様のプロモーター機能を有する塩基配列からなるプロモーターであってもよい。ここでいうストリンジエントな条件でハイブリダイズする塩基配列とは、例えば、6×SSPE、2×デンハルト溶液、0.5%SDS、0.1mg/mlサケ精巣DNAを含む溶液中で65°C、12時間反応させる、という条件下でサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、上記したいずれかの塩基配列を有するDNAとハイブリダイズする塩基配列である。本発明の腫瘍特異的プロモーターは、このような条件でハイブリダイズする塩基配列であって、ハイブリダイズした対象の塩基配列と同様のプロモーター機能、即ち、同程度の腫瘍特異性と同程度のプロモーター活性を有するものである。このような塩基配列としては、ハイブリダイズの対象となる塩基配列と、例えば60%以上、好ましくは65%

以上の相同意を有するものが挙げられる。このような本発明の腫瘍特異的プロモーターとしては、配列表の配列番号1に示す1126～2941番目の塩基配列からなる腫瘍特異的プロモーターとハイブリダイズするものとしては、例えば配列番号1の1251～2941番目(1691bp)または1001～2941番目(1941bp)の塩基配列からなる腫瘍特異的プロモーターが挙げられる。配列表の配列番号1に示す2501～2941番目の塩基配列からなる腫瘍特異的プロモーターとハイブリダイズするものとしては、例えば配列番号1の2626～2941番目(316bp)または2376～2941番目(566bp)の塩基配列からなる腫瘍特異的プロモーターが挙げられる。

上記した本発明の腫瘍特異的プロモーターは、既に報告されているIAI.3Bゲノム遺伝子の配列情報(Gene Bank Human 1A.3B gene, promoter region. ACCESSION U72483)に基づきPCR法を利用する周知の方法により得ることができ。これら的方法は、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。また、上記したストリジエントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有する本発明の腫瘍特異的なプロモーターは、上記した方法、あるいは例えば部位特異的突然変異誘発法、通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記Molecular Cloning等の基本書を参考にして行うことができる。

上記した本発明の腫瘍特異的プロモーターは、高いプロモーター活性を有し、卵巣癌などの腫瘍細胞もしくは腫瘍組織、特に卵巣癌細胞もしくは卵巣癌組織において特異的に高いプロモーター活性を有する。後述する実施例に明らかにされている通り、例えば配列番号1の1126～2941番目の塩基配列(1816bp)からなる本発明の腫瘍特異的プロモーターは、卵巣癌細胞株HEYにおいてSV40プロモーターに比べ約30倍のプロモーター活性を示し、同様に配列番号1の2501～2941番目の塩基配列(441bp)からなる本発明の腫瘍特異的プロモーターは、15倍のプロモーター活性を示す。また、本発明の配列番号1の1126～2941番目の塩基配列(1816bp)からなる腫瘍特異的プロモーターは、卵巣癌細胞株PA-1においてSV40プロモーターの約2000倍、他の卵巣癌細胞株HRAにおいてSV40プロモーターの約70倍のプロモーター活性を発揮し、他方、正常卵巣細胞のNOE1、NOE2、NOE3にお

いてはSV40プロモーターの約25%、正常ヒトケラチノサイト細胞株K42においてもSV40プロモーターの約20%のプロモーター活性しか示さず、従って、特に卵巣癌において特異的に高いプロモーター活性を発揮する。本発明の配列番号1の2501～2941番目の塩基配列（441bp）からなる腫瘍特異的プロモーターも同様に

5 卵巣癌において特異的に高いプロモーター活性を発揮する。

本発明の腫瘍特異的プロモーターは、腫瘍特異的な遺伝子発現による癌の遺伝子治療、例えば、ウイルスを腫瘍細胞あるいは腫瘍組織で特異的に増殖するようウイルス遺伝子を改変した細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを構築するためのプロモーターとして利用できる。

10 このような細胞障害性腫瘍特異的ウイルスは、いわゆるオンコリティックウイルス（oncolytic virus）と呼ばれるものである。このようなウイルスは、例えばアデノウイルスの増殖に必須の遺伝子である初期遺伝子E1AまたはE1Bの上流に本発明の腫瘍特異的プロモーターを挿入するかあるいは初期遺伝子E1AまたはE1Bプロモーターと置換することにより、あるいはヘルペスウイルスの対応する初期15 遺伝子の上流に本発明の腫瘍特異的プロモーターを挿入するかあるいは初期遺伝子プロモーターと置換することにより構築することができる。また、レトロウイルス、レオウイルスなどのその他のウイルスについても、本発明の腫瘍特異的プロモーターの挿入または置換により細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを構築することができる。このようにして構築された細胞障害性腫瘍特異的ウイルスは、腫瘍20 細胞あるいは腫瘍組織で特異的に増殖し腫瘍細胞を殺傷する作用を発揮することができる。従って、このウイルスを投与することにより特に卵巣癌を有効にかつ副作用を軽減して治療することができる。このような細胞障害性腫瘍特異的ウイルスの構築方法、利用方法等については、Carla Heise et al., The Journal of Clinical Investigation, April 2000, Vol. 105, No. 7, 847-851; James R. Bischoff et al., Science, Vol. 274, 18 October 1996, 373-376; J. Nemunaitis et al., Journal of Clinical Oncology, Vol. 19, No. 2, 2001, 25 289-298などの文献が参照される。

本発明の細胞障害性腫瘍特異的ウイルスをヒトへ投与する方法としては、該ウイルスを直接体内に導入するin vivo法やヒトからある種の細胞や組織を取り出

して体外で該ウイルスを該細胞や組織に導入しその細胞や組織を体内に戻すex vivo法などがある。in vivo法としては、例えば本発明の細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを適当な溶剤（PBS等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等）に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填して注射剤
5 を調製して、ヒトへ注射することにより投与される。注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えてもよい。本発明の細胞障害性腫瘍特異的ウイルスは、静脈、筋肉、腹腔、皮膚等に投与することができ、また腫瘍組織内へ直接投与することもできる。ex vivo 法としては、上記したと同様の注射剤などで本発明の細胞障害性腫瘍特異的ウイルスを組織に直接注入してそれを体内に戻す方法などが挙げ
10 られる（日本遺伝子治療学会編、遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。

本発明の細胞障害性腫瘍特異的ウイルスの投与量は、投与する対象、投与方法、投与形態等によって異なるが、通常成人1人当たり $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{14}$ ウイルス粒子数の範囲、好ましくは $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{13}$ ウイルス粒子数の範囲である。
15 本発明の細胞障害性腫瘍特異的ウイルスは、通常臨床的に使用されている抗癌化学療法剤と併用することもできる。併用することにより抗腫瘍活性において相乗効果を発揮することができ、従って両者の投与量を低用量として副作用を軽減しつつ抗腫瘍効果を高めることができる。抗癌化学療法剤としては、シスプラチ
ン、シクロホスファミドなどのアルキル化剤；メトトレキセート、メルカプトプ
20 リン、シトシンアラビノシドなどの代謝拮抗剤；アクチノマイシン、アドリアマイシンなどの抗癌抗生物質；エトポシド、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチンなどの植物アルカロイド；ピシバニール、クレスチンなどの免疫系薬剤；イリノテカン、トポテカンなどのDNAトポイソメラーゼ阻害剤等が挙げられ
る。これらのなかでも、シスプラチ、シクロホスファミド、アドリアマイシン、
25 エトポシド、タキソールなどが好ましい。

更に本発明の腫瘍特異的プロモーターは、薬剤代謝酵素遺伝子と癌治療用プロドラッグとを組み合わせた自殺遺伝子治療、サイトカイン遺伝子などを癌細胞に導入して免疫機能を高めて癌を治療する免疫遺伝子治療などに利用することもできる。

自殺遺伝子治療としては、薬剤代謝酵素遺伝子と癌治療用プロドラッグとの組み合わせが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子とガンシクロビルもしくはアシクロビル、シトシンデアミナーゼ遺伝子と5-フルオロシトシン、水痘帯状疱疹ウイルスシミジンキナーゼ遺伝子と6-メトキシプリアラビノシド、
5 E. coli gpt遺伝子と6-チオキサンチン、チトクローム P450 2B1遺伝子とサイクロフォスファミド、ヒトデオキシシチジンキナーゼ遺伝子とサイトシンアラビノシド、E. coli UPRT遺伝子と5-フルオロウラシル、またはE. coli deoD遺伝子と6-メチルプリン-2'-デオキシリボヌクレオシドの組み合わせなどの例が挙げられる。自殺遺伝子治療を実際に行うには、本発明の腫瘍特異的プロモーター及びその下流に薬剤代謝酵素遺伝子を発現可能なように組み込んだ発現ベクターを構築して、その発現ベクターを癌細胞に導入し、次いで癌治療用プロドラッグを投与することによって実施できる。ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの遺伝子導入に通常用いられるベクターが挙げられる。あるいは、本発明の腫瘍特異的プロモーター及びその下流に薬剤代謝酵素遺伝子を発現可能なように組み込んだプラスミドDNAを、リポソームに封入して、あるいはポリリジン-DNA-タンパク質複合体として、癌細胞に導入することもできる。また、ネイキッドプラスミド (naked plasmid) の形態で癌細胞に導入することもできる。遺伝子を導入するには、これらのベクター、リポソーム封入体等を静脈あるいは動脈内にあるいは直接腫瘍
10 内部や腫瘍周囲に注入することによって行われる。この際、エレクトロポレーション法や超音波を併用することにより遺伝子導入効率を高めることも可能である。
15 遺伝子導入後、癌治療用プロドラッグは、経口、静脈、動脈内投与等の通常の方法により投与される。

導入された遺伝子は、本発明の腫瘍特異的プロモーターの作用によって癌細胞
20 内で特異的に薬剤代謝酵素が発現され、発現された薬剤代謝酵素により、癌細胞内において癌治療用プロドラッグは活性型の癌治療剤へ変換され、この変換された癌治療剤により癌細胞が選択的に死滅して自殺遺伝子治療が完了する。

このような自殺遺伝子治療の手法自体は既に公知であり、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子とガンシクロビルとの組み合わせは、脳腫瘍等で臨床

応用されており (Oldfield, E H, Hum. Gene Ther., 4, 39-69, 1993) 、またシトシンデアミナーゼ遺伝子と5-フルオロシトシンとの組み合わせも、大腸癌などに臨床応用の可能性が示唆されており (Huber, B E et al., Cancer Res., 53, 4619-4626, 1993) 、これらの例が、本発明の遺伝子治療を実施する際に参考される。

本発明の腫瘍特異的プロモーターを利用した免疫遺伝子治療としては、インターフェロン、TNF α 、インターロイキンなどのサイトカインをコードする遺伝子を、上記の自殺遺伝子治療と同様の方法で、本発明の腫瘍特異的プロモーターと共に発現ベクターに組み込み、あるいはリポソームに封入して、あるいはネイキッドプラスミド (naked plasmid) の形態で癌細胞に導入することができる。癌細胞に導入してサイトカインを発現させて、それによりヒトが本来有する生体防御機構である免疫応答を高めて癌を治療する方法が採用される。

また、本発明の腫瘍特異的プロモーターを利用して、癌遺伝子のアンチセンス遺伝子や正常型の癌抑制遺伝子を、腫瘍において特異的に発現させ、その結果、腫瘍の脱癌化（正常復帰）や細胞死（アポトーシス）、更には腫瘍細胞の抗癌剤感受性、放射線感受性の亢進を惹起することもできる。また、本発明の腫瘍特異的プロモーターは、E1欠失部位に前記したサイトカインなどをコードする遺伝子とともに挿入してE1欠失、E1/E3欠失アデノウイルスベクターを構築して、通常行なわれている遺伝子治療に用いることもできる。

本発明の腫瘍特異的プロモーターを利用した遺伝子治療は、特に卵巣癌の治療に有効である。

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例の範囲に何ら限定されるものではない。

実施例 1

25 IAI. 3B遺伝子における腫瘍特異的プロモーターのクローニング

(1) 実験方法

IAI. 3Bのエクソン1およびその上流域160bpに基いてPCR法によりDNAテンプレートを作成し、これを基にしてClontechのEMBL3 SP6/T7 ファージ・ライブラリーよりシングルクローン (pCA1) を分離し、PCRにより IAI. 3Bのエクソン1およびそ

の上流部分1kbが含有されている事を確認した。実験には、卵巣癌細胞株PA-1、HRA、HEY、正常ヒト卵巣細胞NOE1、NOE2、NOE3、子宮頸癌細胞株SKGIIIA、正常ヒトケラチノサイト細胞株K42を用いた。具体的には以下のようにして実験を行った。

- 5 1. SMART PCR cDNA 合成キット (Clontech) により転写開始点 (Cap site) を決定した。
 2. アンチセンスプライマーをエクソン1Bに設定し、センスプライマーを50～500 bp毎に設定することにより、エクソン1Bの上流側のPCR生成物を作成し、これらをルシフェラーゼ (Luciferase) ベクター (PicaGene vector、東洋インキ) のMlu IおよびBgl IIの制限酵素部位に組み込んだ。さらに、二重ルシフェラーゼアッセイキット (Promega) を用いてPCR生成物である欠失変異体 (deletion mutant) のルシフェラーゼアッセイをおこない、プロモーター活性の特定を行った。各欠失変異体と、それを組み込んで得られたルシフェラーゼベクターとの関係を図2に示した。図2において、例えばルシフェラーゼベクタ

10

15

20

25

一pGV-2941は、配列番号1の1～2941番目の2941bpの塩基配列からなる欠失変異体が組み込まれたものである。同様に例えばpGV-1941、pGV-1816、pGV-1691、pGV-566、pGV-441およびpGV-316は、配列番号1のそれぞれ1001～2941番目の1941bpの塩基配列、1126～2941番目の1816bpの塩基配列、1251～2941番目の1691bpの塩基配列、2376～2941番目の566bpの塩基配列、2501～2941番目の441bpの塩基配列および2626～2941番目の316bpの塩基配列からなる欠失変異体が組み込まれたものである。

 3. PCRにより得られ、各ルシフェラーゼベクターに挿入した各欠失変異体については、突然変異のないことを確認するため、配列分析を自動DNAシークエンサー (ABI 310; Applied Biosystems) により行った。
 4. 上記の実験によって決定された各プロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターにより、卵巣癌に対する臓器特異的遺伝子発現について、従来のプロモーター (SV40プロモーター、CMVプロモーター) と比較した。

(2) 結果

転写開始点は、エクソン 1Bであることが明かとなりさらに従来から報告され

ていた (Brown, MA et al., *Oncogene*, 12: 2507-2513, 1996) エクソン 1Bはさらに上流3bpから開始することが明かとなった。また、従来より報告されていた (Brown, MA et al., *Oncogene*, 12: 2507-2513, 1996) エクソン 1Aは転写されていないことも明かとなった。

5 エクソン1Bの5' 上流域の191bpから2941bpまで各欠失変異体を組み込んで作成したルシフェラーゼベクター (図2) について、二重ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した結果、図3に示すように、最も高いプロモーター活性は1816bp上流域にあることが明かとなった。下流域の欠失変異体のプロモーター活性は徐々に減少しはじめ、pGV-941で最も低下し、1691bpから941bpの間に10 ポジティブエレメントのあることが明かとなった。さらに、下流域の欠失変異体のプロモーター活性を比較すると、各活性は上昇しはじめ、pGV-441で最も高い値を示した。このため、816bpから441bpまでにネガティブエレメントのあることが明かとなった。さらに、下流域の欠失変異体を検討すると、プロモーターは15 低下しはじめ、316bpより下流域にポジティブエレメントのあることが明かとなつた。

さらに、図3に示すように、卵巣癌細胞株HEYにおいてpGV-1816のプロモーター活性はSV40プロモーターであるpGV-コントロールに比べ約30倍の活性を示し、CMVプロモーターであるpGV-CMVに比べ約80%程度の非常に高い活性を示すことが明かとなった。

20 また、図4に示すように、他の卵巣癌細胞株PA-1においては、最も高い活性がpGV-1816にありその値はSV40プロモーターの約2000倍で、CMVプロモーターの約2倍であった。さらに、他の卵巣癌細胞株HRAにおいては、最も高い活性がpGV-1816にありその値はSV40プロモーターの約70倍で、CMVプロモーターの約2倍であった。子宮頸癌細胞株SKGIIIAにおいては、pGV-1816のプロモーター活性は、25 SV40プロモーターの5倍でCMVプロモーターの13%であった。他の子宮頸癌細胞株HT3においてもpGV-1816のプロモーター活性は、SV40プロモーターの3倍でCMVプロモーターの5%であった。一方、正常卵巣細胞のNOE1、NOE2、MOE3においてはpGV-1816のプロモーター活性は、SV40プロモーターの約25%であり、CMVプロモーターの0.25%であった。さらに正常ヒトケラチノサイト細胞株K42においてもpGV-1816

のプロモーター活性は、SV40プロモーターの約20%であり、CMVプロモーターの0.7%であった。

以上により、IAI.3B 遺伝子プロモーターは卵巣癌に特異性が高くCMVプロモーターの80%から2倍であった。さらに、子宮頸癌細胞株においても高い活性は認め
5 られ、SV40プロモーターの約2倍から3倍程度であった。一方、正常卵巣細胞およびケラチノサイト細胞においては、活性は低くSV40プロモーターの約20%から30%程度であった。

実施例 2

IAI.3B遺伝子プロモーターの転写活性

10 実施例 1 の (1) の 2. に記載した方法とほぼ同様にして、二重ルシフェラーゼ法により、樹立化卵巣癌細胞株 (OC) 、初代培養卵巣癌細胞株 (pOC) におけるAd-IAI.3B-1816の転写活性を測定した。対照として子宮頸癌 (CC) と正常ヒト卵巣細胞株 (NOE) を用いた。具体的には、実施例 1 の (1) の 2. で構築された配列番号 1 の 1126～2941番目の 1816bp の塩基配列からなるプロモーター
15 IAI.3B-1816を含むルシフェラーゼベクターpGV-1816とコントロールとしてRL-TK ベクターを10:1の比率で混合し、DOTAPリポソーム試薬に結合した後各細胞を播いた細胞培養用の12ウェルプレートの各ウェルに、胎児牛血清を添加しない培養液とともに追加し、2日間培養して、ルミカウンターによりホタルルシフェラーゼ、つぎにウミシイタケルシフェラーゼの測定を行った。転写活性はSV 40のプロモーター活性を1とした時の値で示した。得られた結果は図5、6および7に示した。図5および6は、樹立化卵巣癌細胞株 (OC) におけるAd-IAI.3B-1816の転写活性を子宮頸癌 (CC) と正常ヒト卵巣細胞株 (NOE) における転写活性と比較したものであり、図7は、初代培養卵巣癌細胞株 (pOC) におけるAd-IAI.3B-1816の転写活性を子宮頸癌 (CC) と正常ヒト卵巣細胞株 (NOE) における転写活性を比較したものである。図5、6および7から分かるように、Ad-IAI.3B-1816の樹立化卵巣癌細胞株 (OC) および初代培養卵巣癌細胞株 (pOC) における転写活性は、子宮頸癌 (CC) と正常ヒト卵巣細胞株 (NOE) におけるそれに比べて顕著に高いことが分かる。
20
25

実施例 3

細胞障害性腫瘍特異的アデノウイルスの構築および効果

(1) 細胞障害性腫瘍特異的アデノウイルスの構築

IAI.3B 遺伝子プロモーターによるオンコリティックアデノウイルスを作成するため、図8に示すようにシャトルベクターpXC1 (Graham, FL et al., EMBO J. 3: 2917-2922, 1984) の552bpの位置にTを挿入し、この部位にAgeI 部位を導入し、クレノーフラグメントにより平滑末端にし、この部位にさらにクレノーフラグメントにより平滑末端にしたIAI.3B-1816 (配列番号1の1126～2941番目の1816bpの塩基配列) を挿入した。このシャトルベクターを293細胞においてpBHGE3 (Graham, FL et al., EMBO J. 3: 2917-2922, 1984) と相同組換えし、配列番号1の1126～2941番目の1816bpの塩基配列がアデノウイルスのE1Aプロモーター領域に挿入されたオンコリティックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816を作成した。

(2) 細胞障害性腫瘍特異的アデノウイルスの効果

a) 各種細胞株に対する増殖抑制効果

15 オンコリティックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816の卵巣癌細胞株PA-1、子宮頸癌細胞株SKGIIIA、正常ヒト卵巣細胞株NOE1および正常ヒトケラチノサイト細胞株に対する増殖抑制性効果を検討した。培養条件は、卵巣癌細胞株、子宮頸癌細胞株は、RPMIに10%FCSを加えたものを37°C、5%CO₂にて行った。正常ヒト卵巣細胞および正常ヒトケラチノサイト細胞株に関しては、MCDB液（ニッスイ）に5%FCSを加えて培養を行った。

得られたIC50値を図9に示した。卵巣癌細胞株PA-1においてIC50は0.01MOIであり、これは正常ヒト卵巣細胞株NOE1の20000倍であり、子宮頸癌細胞株SKGIIIAの10000倍であった。

以上により、配列番号1の1126～2941番目の1816bpの塩基配列からなるプロモーターを導入したオンコリティックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816は卵巣癌に特異的に抗腫瘍効果を有することが明かとなった。

b) *in vivo* 抗腫瘍活性

オンコリティックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816の*in vivo*抗腫瘍活性を調べた。即ち、6週令のヌードマウス10匹の背部に1x10⁷個の卵巣癌細胞株PA-1を皮

下に接種し、腫瘍の大きさを観察し、腫瘍の直径が約5mmに到達した時点で2群に分けた。1群のみにオンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816の 1×10^{10} 個のウイルス粒子を、3回（1、3および5日）腫瘍内部に注入した。その後腫瘍塊の大きさをノギスで測定してその体積を求めた。得られた結果を図10に示した。

- 5 図10のグラフから明らかなように、オンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816を腫瘍内に投与した群（Ad-IAI. 3B-1816投与群）では腫瘍は投与直後から退縮し始め、投与20日目以降完全に消失した。これに対して、Ad-IAI. 3B-1816の非投与群（コントロール群）では、PA-1接種後に日数の経過とともに腫瘍の体積が増加した。
- 10 また、図11にオンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816投与群のヌードマウスの50日後の写真（左）およびコントロール群のヌードマウスの50日後の写真（右）を示した。コントロール群の腫瘍の大きさに対し、Ad-IAI. 3B-1816投与群のヌードマウスの投与部位では（左側のヌードマウスの右背部）癌は完全に消失した。
- 15 c) 各種細胞株に対するin vitro抗腫瘍活性

上記a)と同様にして、オンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816の卵巣癌細胞株、子宮頸癌細胞株、正常ヒト卵巣細胞株および正常ヒトケラチノサイト細胞株に対する増殖抑制効果を検討した。卵巣癌細胞株、子宮頸癌細胞株はRPMIに10%FCSを加えたものを37°C、5%CO₂にて行った。正常ヒト卵巣細胞株、正常ヒトケラチノサイト細胞株に関しては、MCDB液（ニッスイ）に5%FCSを加えて培養した。培養は3000cells/well(n=3)で開始し各MOIで感染後IC50値を測定した。得られた結果を表1に示した。表1の結果から明らかなように、卵巣癌細胞株（PA-1、RMG-1、420、OCC-1、OVCAR3、KK、KF、429、DOV13およびMH）においてのみオンコリティックアデノウイルスAd-IAI. 3B-1816の高い細胞障害活性が認められた。

表1：オンコリティックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816のin vitro抗腫瘍活性

	<u>細胞株</u>	<u>IC50値(MOI)</u>
卵巣癌細胞株		
5	PA-1	0.014
	RMG-1	0.019
	420	0.015
	OCC-1	0.02
	OVCA3	0.024
10	KK	0.1
	KF	0.19
	429	0.884
	DOV13	0.858
	MH	0.9
15	子宮頸癌	
	ME-180	170
正常ヒト卵巣細胞株		
	NOE-1	315.2
	NOE-2	104.91
20	NOE 3	125.31
正常ヒト-ケラチノサイト		
	K-42	342.9

d) シスプラチンとの相乗効果

25 オンコリティックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816とシスプラティン(CDDP)との抗癌相乗効果を卵巣癌細胞株PA-1で検討した。即ち、12ウェルプレートに300個／ウェルのPA-1細胞を播き、翌日オンコリティックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816あるいはシスプラチンを添加し、9日間培養を行った。培養液はRPMI培養液で10%胎児牛血清添加し、37°C、5%CO₂の状態で行った。培養終了後トリバンプル

一染色を行い生存している細胞数を測定することにより、それぞれの増殖抑性効果をIC50を計算することにより相乗効果を検討した。得られた結果を図12に示した。図12の結果から分かるように、PA-1はAd-IAI.3B-1816のMOI 0.001及びCDDPの0.01 μ g/mlをそれぞれ単独で9日間作用させた時には細胞障害を受けなか
5 った。しかしこの条件下で両者を併用するとPA-1の細胞数は9日間の培養で半分以下に減じ、Ad-IAI.3B-1816とシスプラティンの間に相乗効果が確認された。

産業上の利用の可能性

以上から明らかな通り、IAI.3B遺伝子のプロモーター活性は、転写開始点より
10 1816bp上流側に最も高い活性があり、卵巣癌細胞株においてCMVプロモーターとほぼ同様の転写活性があり、子宮頸癌細胞株においてはSV40 プロモーターの2倍から3倍の活性を示し、正常卵巣細胞およびケラチノサイトでは活性が低くSV 40 プロモーターの20から30%程度の極めて低い活性値であった。従って、IAI.3B遺伝子プロモーターは特に卵巣癌に特異性が高く、他の癌細胞においても正常細胞
15 に比べ高い活性が認められた。また、本発明により作成されたオンコリティックアデノウイルスにより非常に高い抗腫瘍効果が卵巣癌細胞株において認められ、卵巣癌の治療剤として十分に期待できるものである。この本発明プロモーターは、通常のE1欠失あるいはE1/E3欠失のアデノウイルスベクターにも使用できるものであり、さらに最近行われているネイキッド(naked) プラスミドベクターによる
20 遺伝子治療あるいはリボソームを用いた遺伝子治療にも使用可能である。本発明の腫瘍特異的プロモーターによる卵巣癌特異的遺伝子発現により副作用を軽減せしめ、大量投与が可能となり遺伝子治療の臨床的有用性がさらに高めることができる。

請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号 1 に示す 1126～2941 番目または 2501～2941 番目の塩基配列を有する腫瘍特異的プロモーター。
- 5 2. 配列表の配列番号 1 に示す 1126～2941 番目または 2501～2941 番目の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、それらの塩基配列と同様のプロモーター機能を有する腫瘍特異的プロモーター。
3. 配列表の配列番号 1 に示す 2626～2941 番目、2376～2941 番目、1251～2941 番目または 1001～2941 番目の塩基配列を有する、請求項 2 の腫瘍特異的プロモーター。
- 10 4. 卵巣癌に特異的な請求項 1 から 3 のいずれかの腫瘍特異的プロモーター。
5. 請求項 1 から 4 のいずれかの腫瘍特異的プロモーターを用いてウイルスを腫瘍細胞あるいは腫瘍組織で特異的に増殖するようにウイルス遺伝子を改変した細胞障害性腫瘍特異的ウイルス。
- 15 6. 卵巣癌に特異的な請求項 5 の細胞障害性腫瘍特異的ウイルス。
7. ウィルスがアデノウイルスである請求項 5 または 6 の細胞障害性腫瘍特異的ウイルス。
8. 抗癌化学療法剤とともに用いるための請求項 5 から 7 のいずれかの細胞障害性腫瘍特異的ウイルス。
- 20 9. 請求項 5 から 8 のいずれかの細胞障害性腫瘍特異的ウイルスをヒトに投与することからなる腫瘍の治療方法。
10. 細胞障害性腫瘍特異的ウイルスとともに抗癌化学療法剤を投与する請求項 9 の治療方法。

FIG. 1

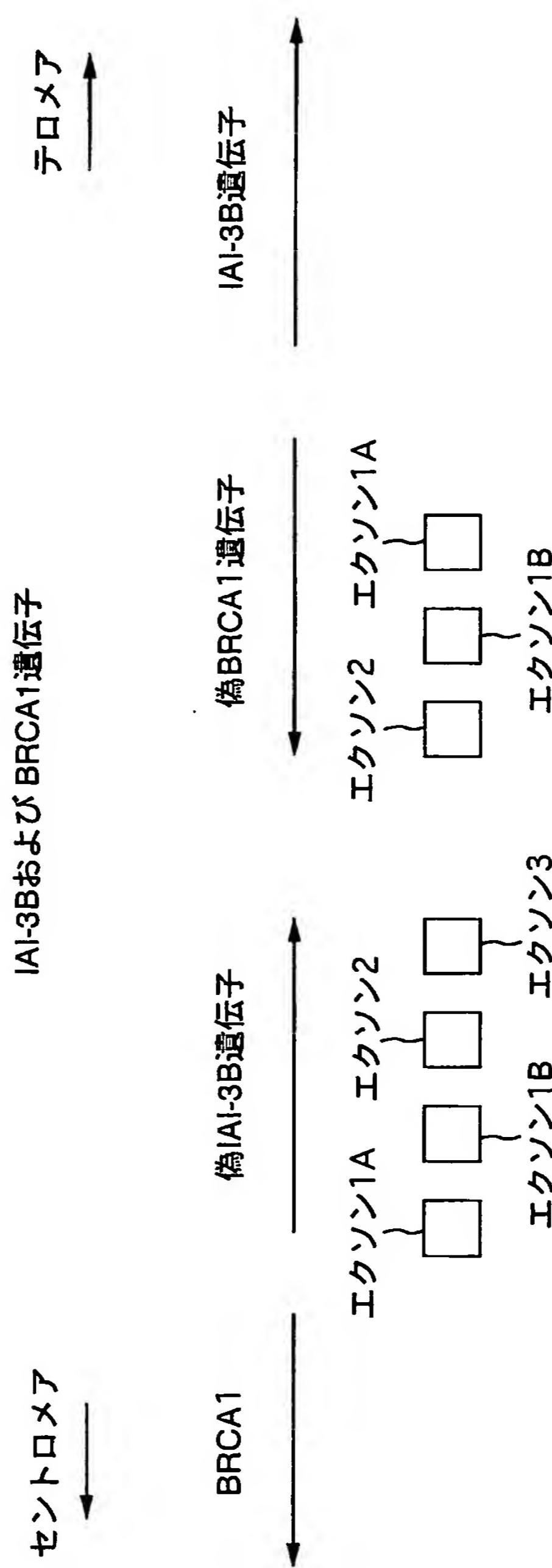


FIG. 2

IAI-3B遺伝子のルシフェラーゼベクター

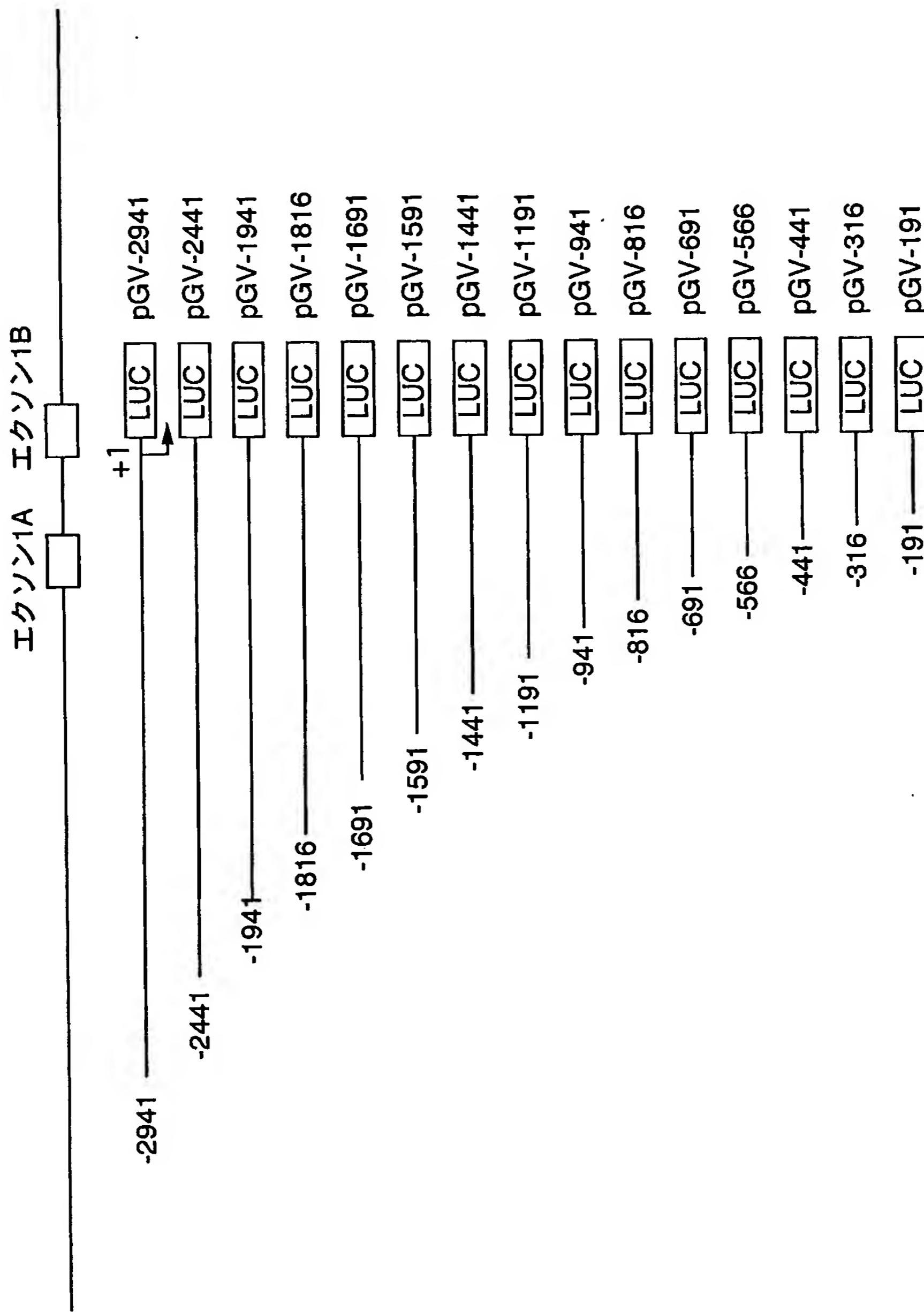


FIG. 3

IAI遺伝子のレポーターべクターのHEY株におけるルシフェラーゼ活性

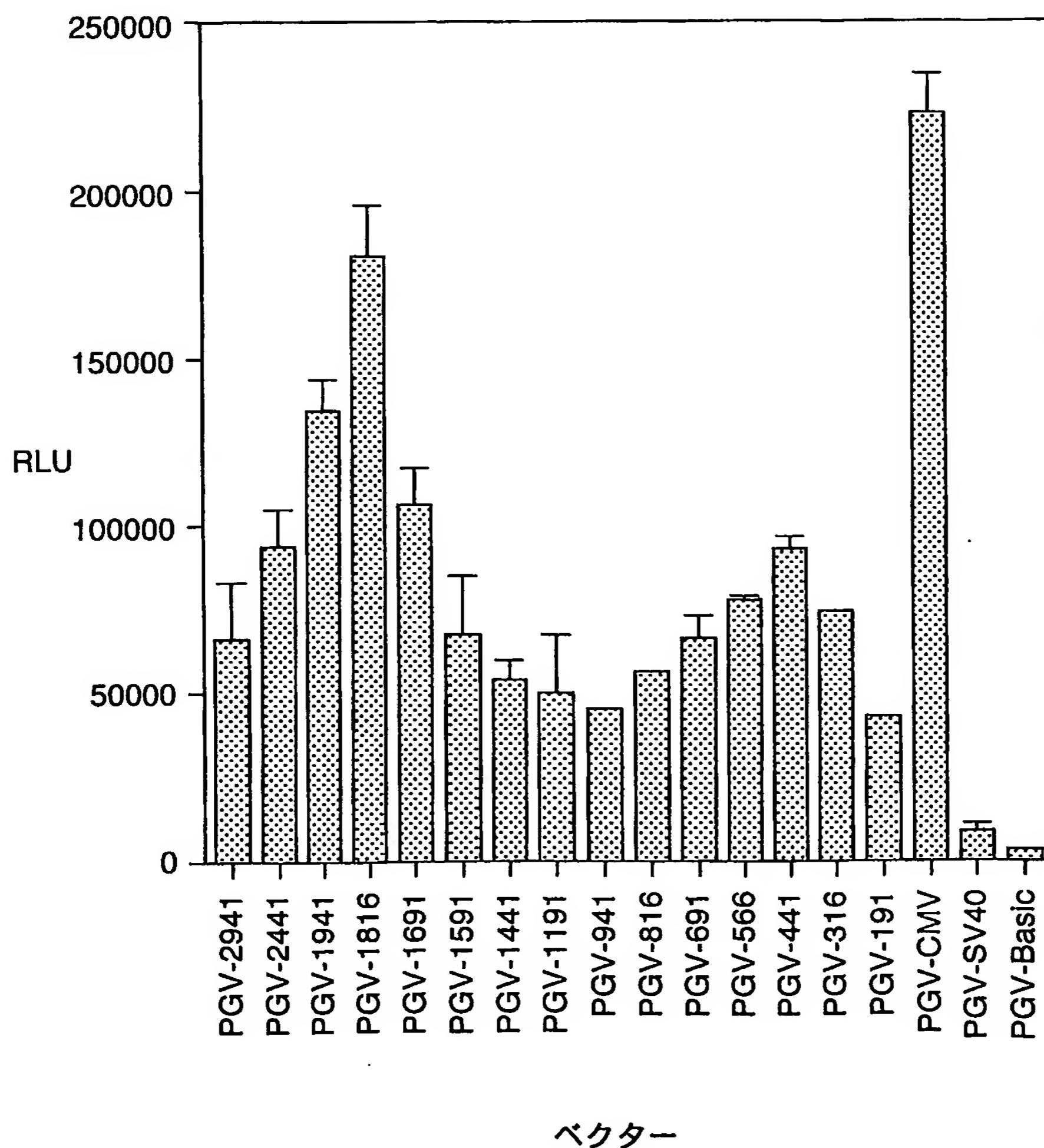


FIG. 4

IAI3BおよびCMVのレポーターべクター
ルシフェラーゼ活性

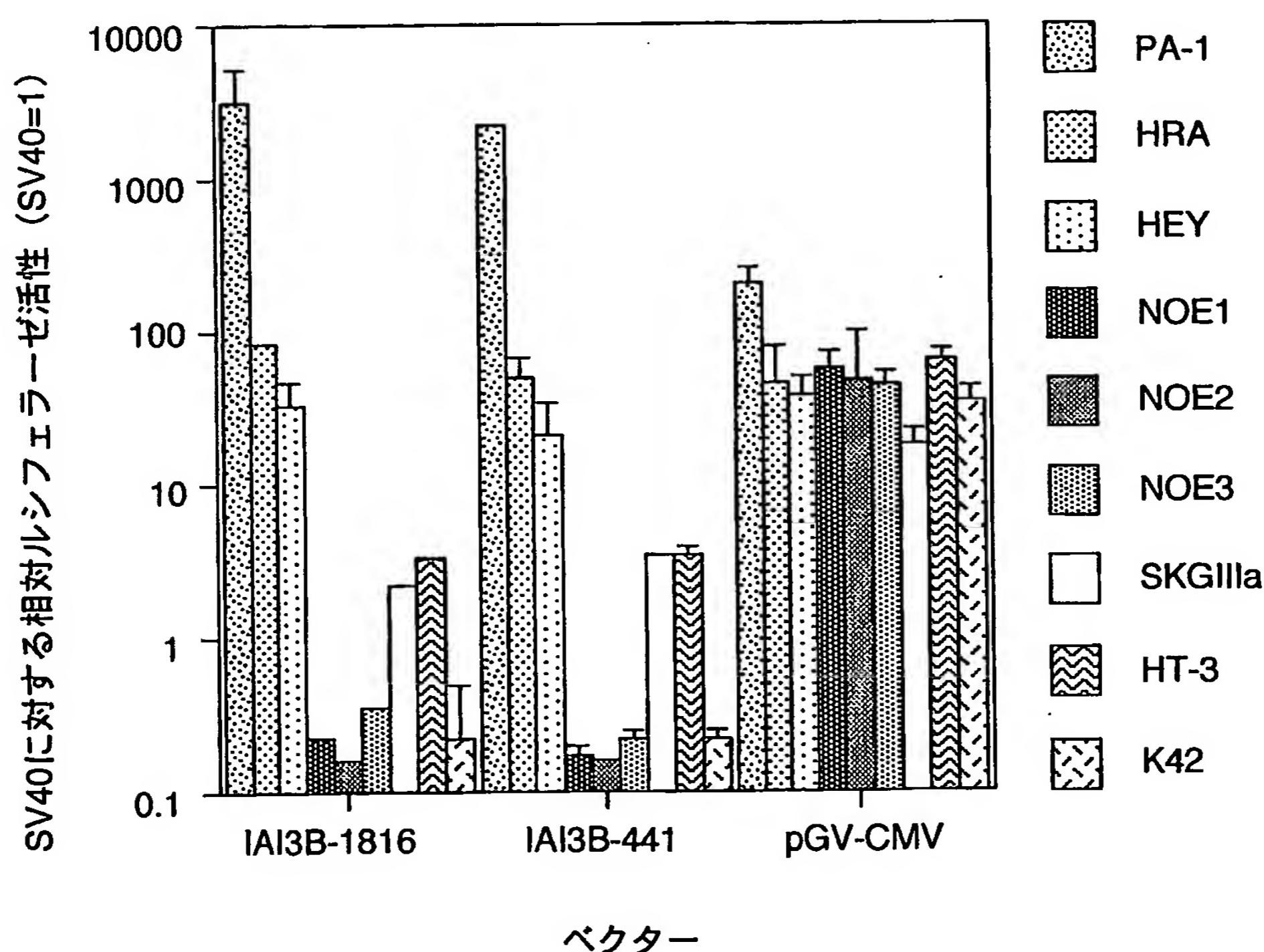
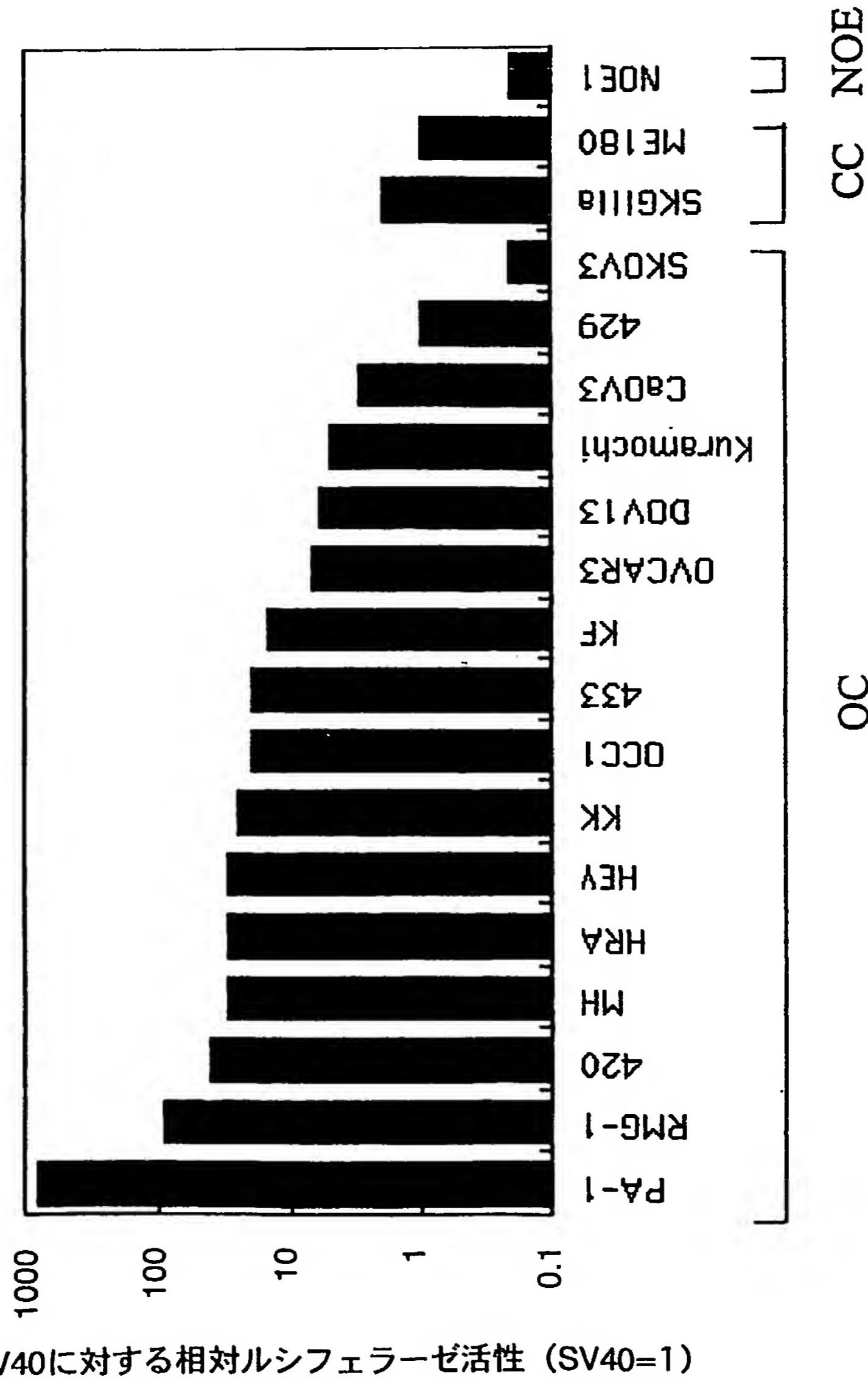


FIG. 5
樹立化卵巣癌細胞株 (OC)、子宮頸癌 (CC) および正常ヒト卵巣細胞株 (NOE)
におけるIAI.3B-1816の転写活性



樹立化卵巣癌細胞株 (OC) 、子宮頸癌 (CC) および正常ヒト卵巣細胞株 (NOE)
におけるAI.3B-1816の転写活性

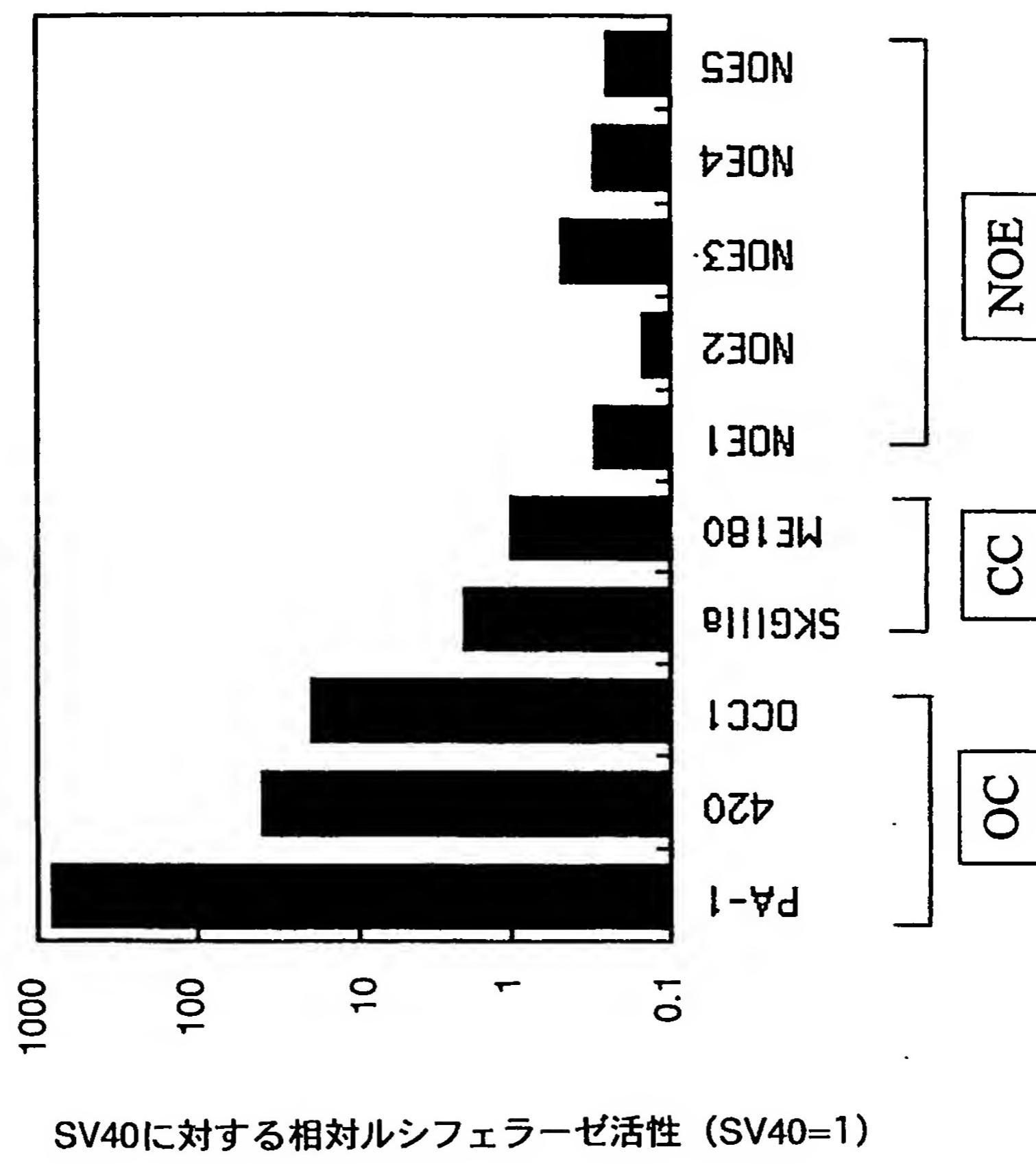


FIG. 6

7 / 12

FIG. 7

初代培養卵巣癌細胞株 (pOC) 、子宮頸癌 (CC) および正常ヒト卵巣細胞株 (NOE)
におけるAI.3B-1816の転写活性

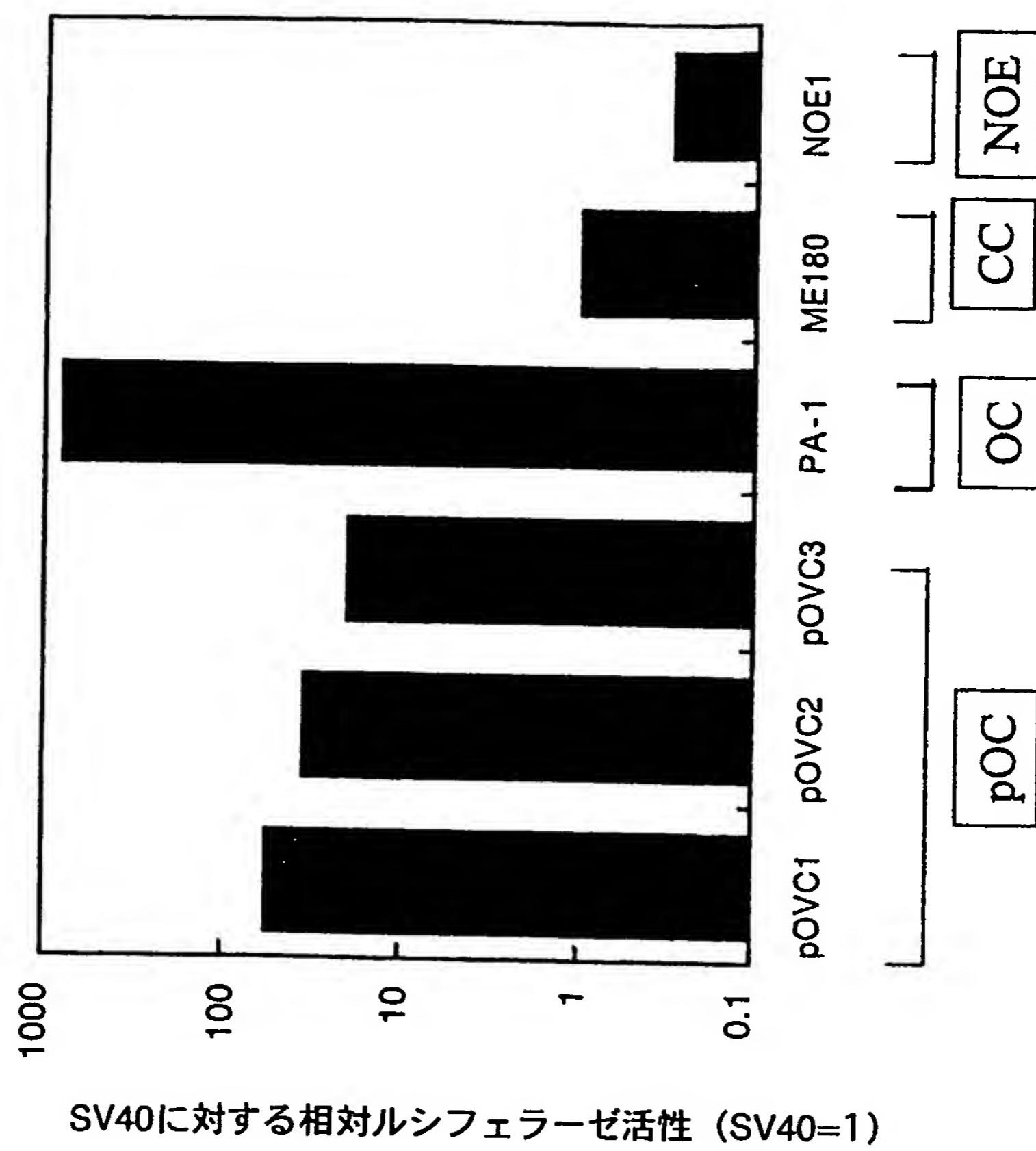


FIG. 8

細胞障害型卵巣癌特異的 アデノウイルス (Ad-IAI.3B-1816) の作成

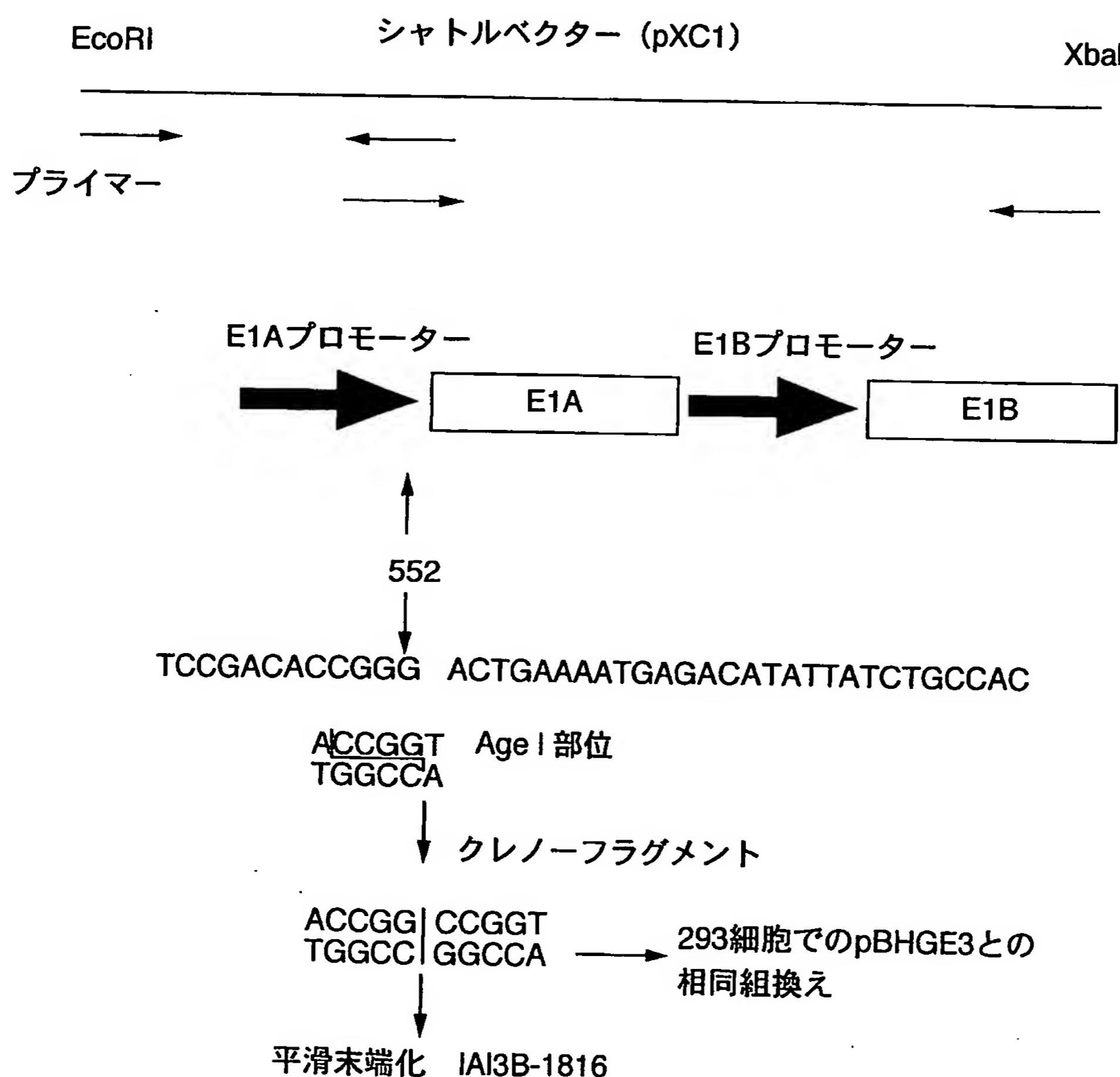
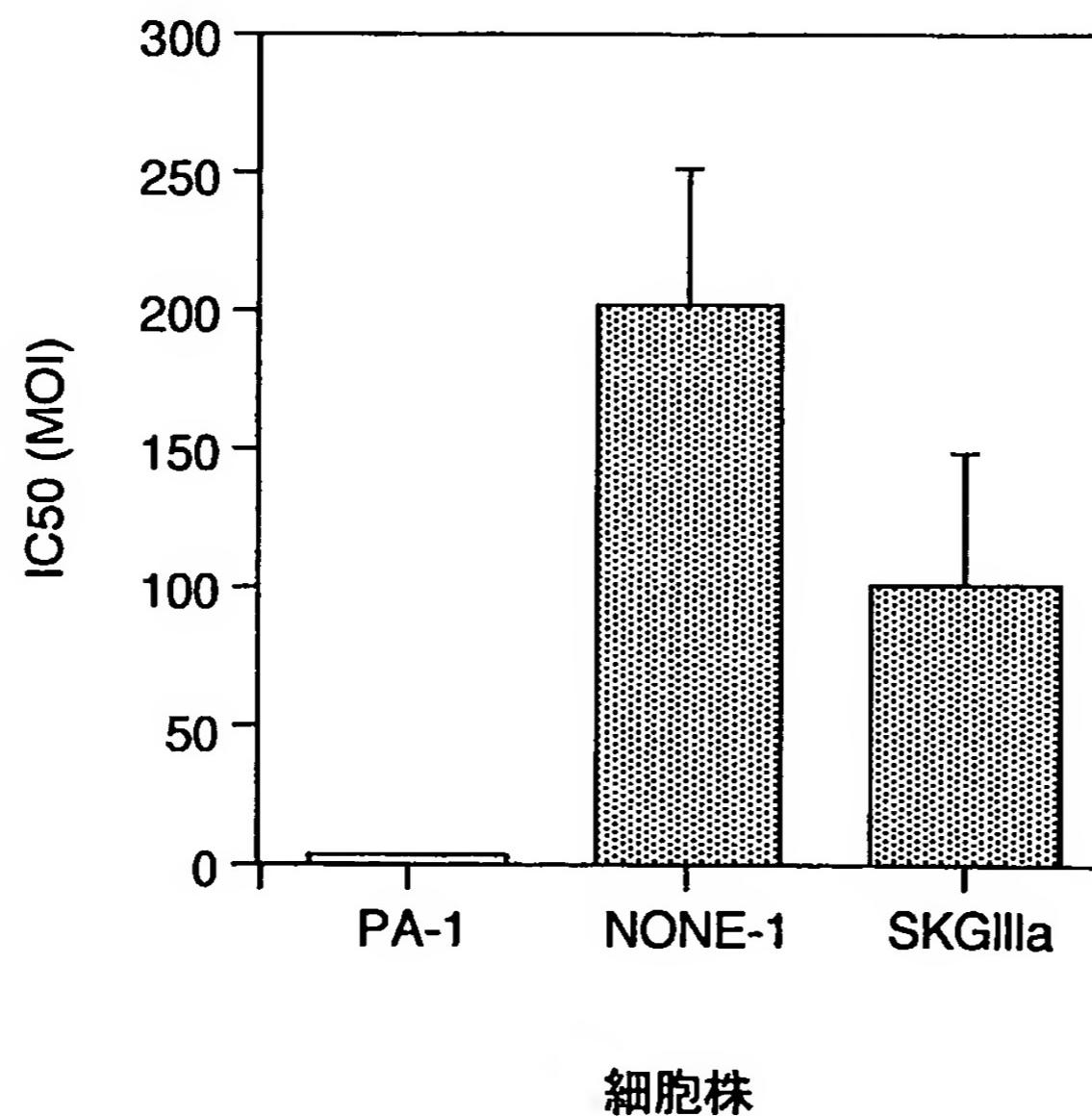


FIG. 9

各種細胞株に対するオンコリイテックアデノウイルス
Ad-IAI.3B-1816の細胞障害活性



10 / 12

FIG. 10

オンコリイテックアデノウイルス
Ad-IAI.3B-1816のin vivo抗腫瘍活性

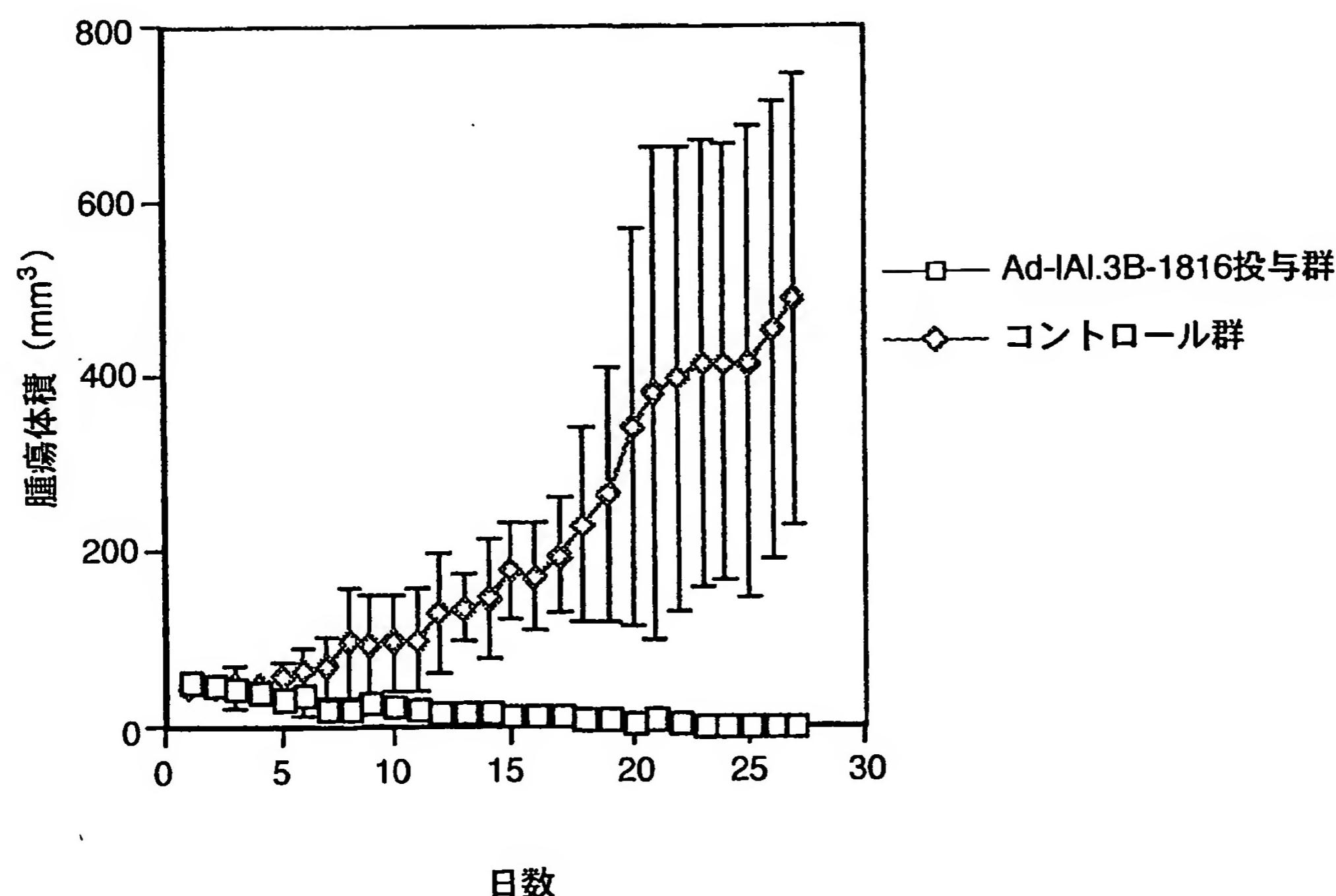


FIG. 11

オンコリイテックアデノウイルス
Ad-IAI.3B-1816のin vivo抗腫瘍活性

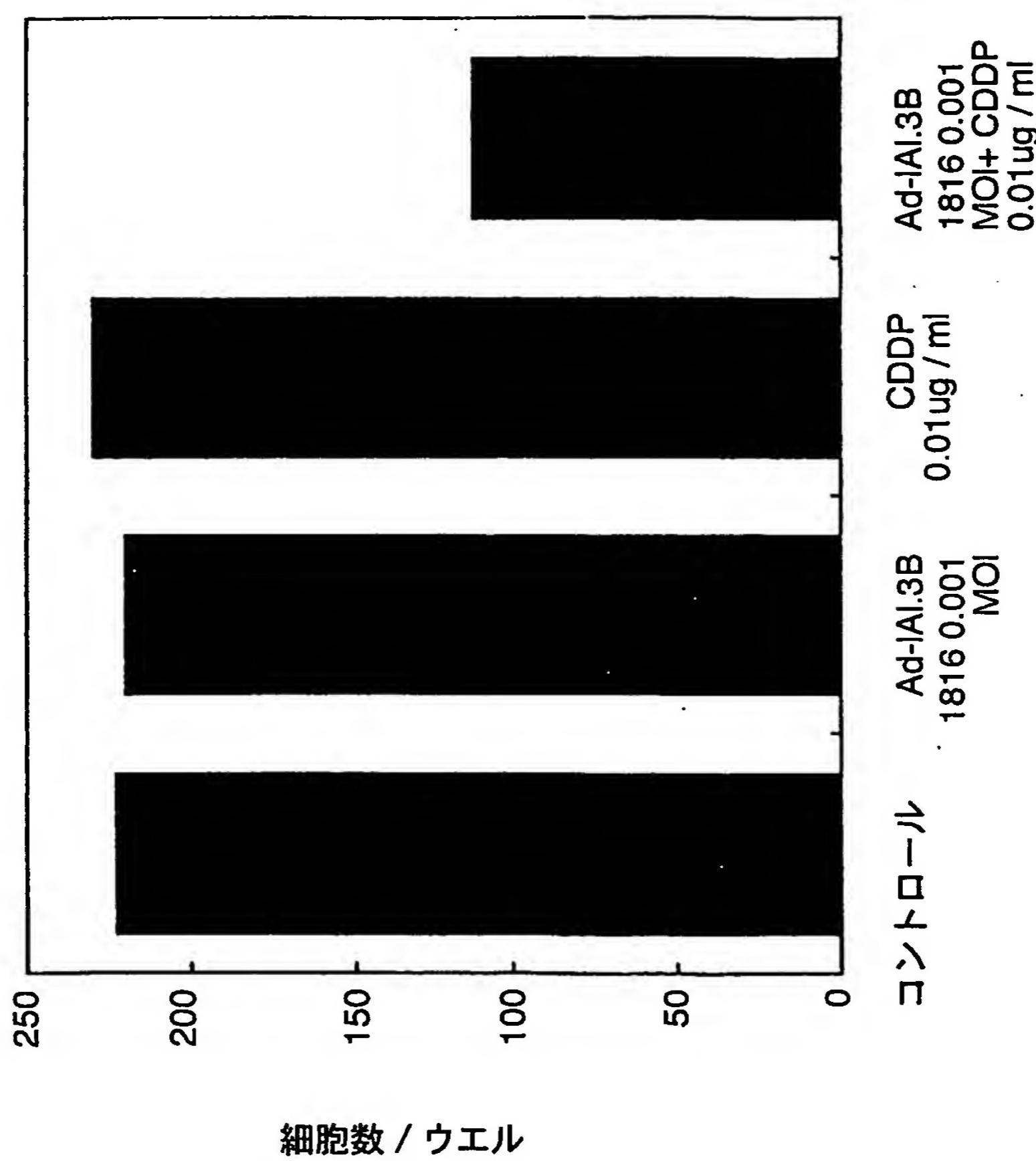


Ad-IAI.3B-1816投与群

コントロール群

12 / 12

FIG. 12 卵巣癌細胞株に対するオンコリイテックアデノウイルスAd-IAI.3B-1816とCDDPとの細胞増殖抑制相乗効果



SEQUENCE LISTING

<110> Primimmune Corporation

5 <120> Tumor Specific Promotor and its Use

<130> W0142-00

<150> JP 2001-279088

10 <151> 2001-9-14

<160> 1

<210> 1

15 <211> 2941

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

20	aaacatgtat cttttaaaaa ggtttagaaa aatgacaact tcattttatc attttaaaat	60
	aaggtaaatt gggctggcg tcggtggtc acgcctgtca atcacagcac ttagggaggc	120
	cgaggcgggc ggatgacctg aggtcgggag ttcaagacca gcctgaccaa tacggagaaa	180
	cctcgtttct actaaaaata caaaaaaatg agccaggcat ggtggtgcat gcgtgtaaatc	240
	ccagctactc gggagctgag gcaggagaat cgcttgaacc cacgagtcag aggttgcggt	300
25	gagcccaaat cacgccgatt acactccagc ctggcaaca agagcgaagc tccgtctcaa	360
	aaataaataa aataaaataa ggttaattt a gatttggaa ggttttagaa taataaaaa	420
	tcctttaaag gttctagaag ttgcttttg taatttagaca atataaattc tgtattttt	480
	cacatattgc ttccaaccct ttgggtcttt tccttctcc aagaaagaga aagctacagg	540
	ggagtgactg accgggtaag tggtgagctt tctccaatgc ttctggctgt tttcttttc	600

ttgcataaaa ccaaaatcaa caacgaccaa accaacacca atcaaggcct ccctgccct 660
agccttccc agcgacccac tctcatctca ggatccccct caagcacatc cctgccggca 720
gcatctgtta ctactgacgc tcctctactt ccctcttgcg ctttctcaat agcacaaatg 780
gatccagttc ttaagttctc cctcccacaa aatcctgtct cctcccttc ccagacatat 840
5 tcctggcact tcttcttccg caagggccca tcttctcata tataccagcc ggtgtttatt 900
tctttgttg ttttgagac ggagtgtcgt tctgccaccc aggctggagt gcaatggcgc 960
gatctcggct cactgcaacc tccgcctcct gggttcaagc gatttcctg cctcagctcc 1020
tgagtagctg gcgcgcgcca ccacgcccgg ctaattttg tatttttagt agagacgggg 1080
tttcaccacg atggtcaggc tggtctcgaa ctcctgacct cgtgatccat ccgccttggc 1140
10 ctccccaaagt gcttagaata caggcgtaag ccaccatccc cggcgaccag ctgatgttct 1200
tatacacatg gtgtccctt caaggcacat tccagttcct atcaggagga ttccctcctcg 1260
gacacactgt gcccccaacc tgatccttag tgcttcctc gagacctaca aactgcccc 1320
ttccccgggg ggttcacaac gccttatgcc tctcagggttc cggcccccggc cctcgataa 1380
gaatacccat ctgcctagct tcggaaattc actttcccccc gcccgtcccc cggagcatcc 1440
15 cttggggccc tgtcccttc cggggctct tctacctaa cccagagcag agggtgcagg 1500
cctcctgagc ccagggccc agttatctga gaaaccccac ggcctgtccc ccgtccagaa 1560
cgtctcagcg agtcacgac gcgcagtcac gttttttcc cccctctac attgcagatg 1620
tggctcccaa tggcacgtt gccaggacc ttgc当地 aaaaatggca aaaatggca 1680
atatttacac tggctgctt aataaggca ttgatctt cctccgtaaa ggtcacctca 1740
20 tagtcctgca gaatgaggc agagtagatg caggcaagct gggagacgga ggccatagcg 1800
cggcgagtg tgggctgg gctgccggac gcgggtctac tcaccggatg aagtgggggt 1860
ctcaccccaa cgccgccta gttcctcgg aaggaccgaa cacctggcg gcagccgagg 1920
aaagggttc cacagtttta atttatctgt aattccacg cttactgtt gccacggaaa 1980
ccgctgagca atgcctc agaataggaa atcaagacac agtcagagga agggcgggac 2040
25 agaaagagcc tagcatctct cggggctctg ggttggccac ccagtccctcc cctgggtgaca 2100
taaaaaagaaa gagacggaaa aggaagaatt ctacctgagt tcgc当地 aaaaatggca 2160
tctcgccctct acgcttccag ttgc当地 aaaaatggca 2220
agaatcgcca cctgaggcct gaatatcagc gtaagatgt gtccaaagca gtcttaagaa 2280
gaggtcccat taccctactc ttccgcctt aatggaggtc tccagtttag gtaaataaaa 2340

ggattgttgg gaggtggagg gaaagaacta ctattccaa catgcattgc ggaacgaaag 2400
gccttggcca cactgttcct tggaaactgt agtcttatgg agaggaacat ccaataccaa 2460
agcgggcaca attctcacgg aaatccagtg gatagattgg agacctccgc gggcttatac 2520
atgtcaacag taatggattg gagtgttgtt atgttctcct atcttgagag cagagactag 2580
5 gccaaaaaaa gatacctaca actccttagga agactacgat tcccatccag ccccacgagt 2640
ctcggcaag tagtcctcta aggtcagtgg cctgcgggga cgcagtggc gccgaatttg 2700
cctgggaag gggaaatccg ctctggccca catctgcgca ctcctagttc cgccccctcag 2760
cctcaatgtt tgttattgtt gttcggttc aggttgcttc tgccccgcc catcgacgca 2820
atctccacca atcaatggcg tggtcgtttt gagggacaag tggtagagc caatcatctt 2880
10 ggcgaacact cggagaaaca gggactagt tactgtctt atccgccatg ttagattcac 2940
c 2941

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/861, C12N7/01, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/861, C12N7/01, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	David F. Barker, et al., The BRCA1 and 1A1.3B Promoters Are Parallel Elements of a Genomic Duplication at 17q21. Genomics, December 1996, Vol.38, No.2, pages 215 to 222	1-4
Y	WO 98/23779 A1 (Univ. Utah Research Foundation), 04 June, 1998 (04.06.98)	5-8
Y	Carla Heise et al., Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. The Journal of Clinical Investigation, April 2000, Vol.105, No.7, pages 847 to 851	5-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 04 April, 2002 (04.04.02)	Date of mailing of the international search report 16 April, 2002 (16.04.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00724

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
They pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/00724

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' C12N15/861, C12N7/01, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' C12N15/861, C12N7/01, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq,
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	David F. Barker, et al.,	1-4
Y	The BRCA1 and 1A1.3B Promoters Are Parallel Elements of a Genomic Duplication at 17q21. Genomics, December 1996, Vol. 38, No. 2, p. 215-222	5-8
X	WO 98/23779 A1 (Univ. Utah Research Foundation) 1998.06.04	1-4
Y		5-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に旨及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 04.04.02	国際調査報告の発送日 16.04.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 田村 明照 {印} 4B 8412 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Carla Heise et al., Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. The Journal of Clinical Investigation, April 2000, Vol. 105, No. 7, p. 847-851	5-8

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 9, 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
人体の治療方法に係る発明が記載されている。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。